



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/53, C12P 7/42, 7/62, 11/00, 13/02		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/42590
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	26. August 1999 (26.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/01017		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Februar 1999 (18.02.99)			
(30) Prioritätsdaten: 388/98 18. Februar 1998 (18.02.98) CH			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): LONZA AG [CH/CH]; (Geschäftsleitung: 4002 Basel), CH-3945 Gampel (CH).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PETERSEN, Michael [DE/CH]; Sandstrasse 7, CH-3930 Visp (CH). BIRCH, Olwen [GB/CH]; Weingartenweg 16, CH-3930 Visp (CH). SHIMIZU, Sakayu [JP/JP]; Kyoto University, Sakyo-Ku, Kyoto 606-8502 (JP). KIENER, Andreas [CH/CH]; Meisenweg 5, CH-3930 Visp (CH). HISCHIER, Marie-Luise [CH/CH]; Sandstrasse 1, CH-3930 Visp (CH). THÖNI, Susanne [CH/CH]; Bahnhofstrasse 3, CH-3904 Naters (CH).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. Mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäss Regel 13bis getrennt von der Beschreibung.	
(74) Anwälte: RITTHALER, Wolfgang usw.; Winter, Brandl & Partner, Alois-Steinecker-Strasse 22, D-85354 Freising (DE).			

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING TRIFLUORO-3(R)-HYDROXYBUTYRIC ACID DERIVATIVES

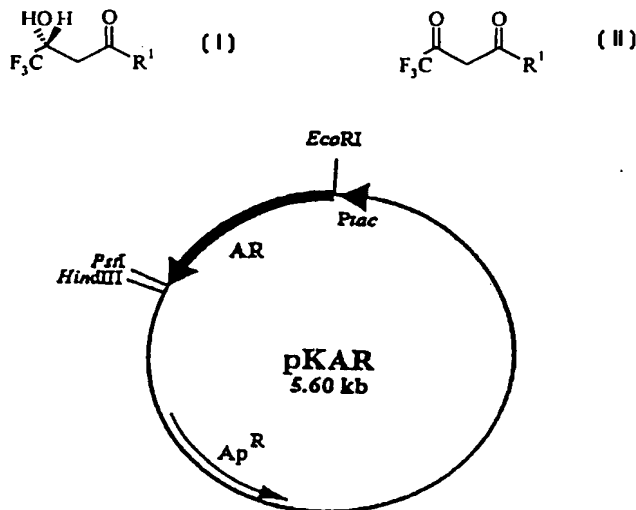
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON TRIFLUOR-3(R)-HYDROXYBUTTERSÄUREDERIVATEN

(57) Abstract

The invention relates to a biotechnological method for producing trifluoro-3(R)-hydroxybutyric acid derivatives of the general formula (I), where R¹ represents -OR², where R² is hydrogen, C₁₋₁₀ alkyl, C₁₋₁₀ alkenyl, C₃₋₈ cycloalkyl, aryl, alkoxyalkyl or alkoxyalkoxyalkyl; -NR³R⁴, where R³ and R⁴ are the same or different and represent hydrogen, C₁₋₁₀ alkyl, C₁₋₁₀ alkenyl, C₃₋₈ cycloalkyl or aryl; or -SR⁵, where R⁵ represents hydrogen, C₁₋₁₀ alkyl, C₁₋₁₀ alkenyl, aryl or C₃₋₈ cycloalkyl, based on a trifluoroacetoacetic acid derivative of the general formula (II), where R¹ has the meaning given above, by means of micro-organisms which are able to reduce a carbonyl function or by means of a cell-free enzyme extract of said micro-organisms.

(57) Zusammenfassung

Beschrieben wird ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel (I), worin R¹-OR², worin R² Wasserstoff, C₁₋₁₀-Alkyl, C₁₋₁₀-Alkenyl, C₃₋₈ Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist, -NR³R⁴, worin R³ und R⁴ gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff, C₁₋₁₀-Alkyl, C₁₋₁₀-Alkenyl, C₃₋₈-Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder -SR⁵, worin R⁵ Wasserstoff, C₁₋₁₀-Alkyl, C₁₋₁₀-Alkenyl, Aryl oder C₃₋₈-Cycloalkyl ist, bedeutet, ausgehend von einem Trifluoroacessigsäurederivat der allgemeinen Formel (II), worin R¹ die genannte Bedeutung hat, mittels Mikroorganismen, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

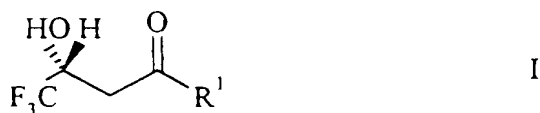
Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten

Die Erfindung betrifft ein neues biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel

5



Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate wie 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester sind wichtige Zwischenprodukte zur Herstellung von Pharmazeutika wie
10 beispielsweise zur Herstellung von Befloxatone, einem Monoaminoxidase-A-Inhibitor (EP-A-0 736 606).

Zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureester sind bereits mehrere biotechnologisches Verfahren bekannt.

15 Guerrero, A. & Raja, E. (Bioorganic Chemistry Letters 1(12), 675 – 678) beschreiben ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester ausgehend von dem entsprechenden Racemat mittels *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei wird das gewünschte Produkt in schlechter Enantiomeren-Reinheit erhalten.

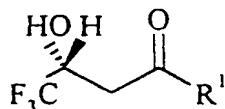
Die EP-A-0 736 606 beschreibt ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von
20 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester mittels der Lipase Novozym 435. Nachteilig bei diesem Verfahren ist die mässige Ausbeute an dem gewünschten Produkt.

Die EP-A-0 577 446 umfasst ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von optisch
25 aktivem 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von dem entsprechenden racemischen Ester mittels Lipasen. Nach diesem Verfahren wird das Produkt in geringer Ausbeute und in schlechter optischer Reinheit erhalten.

Die WO 89/02 470 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-
30 hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von racemischem 4,4,4-Trifluor-3-acyloxy-

Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten

Die Erfindung betrifft ein neues biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel



Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate wie 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester sind wichtige Zwischenprodukte zur Herstellung von Pharmazeutika wie beispielsweise zur Herstellung von Befloxatone, einem Monoaminoxidase-A-Inhibitor (EP-A-0 736 606).

Zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureester sind bereits mehrere biotechnologisches Verfahren bekannt.

Guerrero, A. & Raja, E. (Bioorganic Chemistry Letters 1(12), 675 – 678) beschreiben ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester ausgehend von dem entsprechenden Racemat mittels *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei wird das gewünschte Produkt in schlechter Enantiomeren-Reinheit erhalten.

Die EP-A-0 736 606 beschreibt ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester mittels der Lipase Novozym 435. Nachteilig bei diesem Verfahren ist die mässige Ausbeute an dem gewünschten Produkt.

Die EP-A-0 577 446 umfasst ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von optisch aktivem 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von dem entsprechenden racemischen Ester mittels Lipasen. Nach diesem Verfahren wird das Produkt in geringer Ausbeute und in schlechter optischer Reinheit erhalten.

Die WO 89/02 470 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von racemischem 4,4,4-Trifluor-3-acyloxy-

buttersäureethylester mittels hydrolytischen Enzymen. Dabei wird jedoch das entsprechende Produkt nicht in enantiomerenreiner Form erhalten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten zur Verfügung zu stellen, mit welchem das gewünschte Produkt in guter optischer Reinheit und mit guter Ausbeute isoliert werden kann.

Diese Aufgabe wird mit dem Verfahren nach Anspruch 1 gelöst.

Erfindungsgemäss wird das Verfahren derart durchgeführt, dass man ein Trifluoracetessigsäurederivat der allgemeinen Formel



worin

R^1 $-\text{OR}^2$, worin R^2 Wasserstoff, C_{1-10} -Alkyl, C_{1-10} -Alkenyl, C_{3-8} -Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist,

$-\text{NR}^3\text{R}^4$, worin R^3 und R^4 gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff, C_{1-10} -Alkyl, C_{1-10} -Alkenyl, C_{3-8} -Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder

$-\text{SR}^5$, worin R^5 Wasserstoff, C_{1-10} -Alkyl, C_{1-10} -Alkenyl, Aryl oder C_{3-8} -Cycloalkyl ist, bedeutet,

mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen, in die Verbindung der allgemeinen Formel



worin R¹ die genannte Bedeutung hat, überführt.

Als C₁₋₁₀-Alkyl kann im folgenden eine verzweigte oder unverzweigte primäre, sekundäre oder
5 tertiäre aliphatische Gruppe wie Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, sec-Butyl, tert-Butyl, Pentyl, Isopentyl, sec-Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl oder Decyl verwendet werden. Vorzugsweise bedeutet C₁₋₁₀-Alkyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl oder Hexyl.

Als C₁₋₁₀-Alkenyl können beispielsweise Ethenyl, Propenyl, Allyl und Butenyl verwendet
10 werden. Vorzugsweise wird Allyl verwendet.

Aryl bedeutet bevorzugt substituiertes oder unsubstituiertes Benzyl, Phenyl oder Naphtyl. Als substituiertes Benzyl kann beispielsweise halogeniertes Benzyl wie Chlor- oder Brombenzyl verwendet werden. Vorzugsweise wird unsubstituiertes Benzyl eingesetzt.

15 C₃₋₈-Cycloalkyl bedeutet bevorzugt Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl oder Cyclooctyl, vorzugsweise Cyclohexyl.

Alkoxyalkyl bedeutet bevorzugt C₁₋₆-Alkoxyethyl wie Methoxyethyl und Ethoxyethyl,
20 besonders bevorzugt Ethoxyethyl.

Alkoxyalkoxyalkyl bedeutet bevorzugt 2-(2-C₁₋₆-Alkoxy-ethoxy)-ethyl wie 2-(2-Methoxy-ethoxy)-ethyl und 2-(2-Ethoxy-ethoxy)ethyl, wobei letzteres besonders bevorzugt eingesetzt wird.

25 Bevorzugte Edukte sind demnach Trifluoracetessigsäureethyl-, Trifluoracetessigsäurepropyl-, Trifluoracetessigsäureisopropyl- und Trifluoracetessigsäurehexylester, Trifluoracetessigsäurecyclohexylester, Trifluoracetessigsäurebenzylester, Trifluoracetessigsäureethoxyethylester, und Trifluoracetessigsäureethoxyethoxyethylester.

30 Zweckmäßige Mikroorganismen, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, sind beispielsweise Mikroorganismen, die ein exprimierbares Gen für ein Enzym enthalten, das

befähigt ist eine Carbonylfunktion zu reduzieren, beispielsweise ein Enzym mit Reduktase-Aktivität, insbesondere ein Gen für eine Aldehydreduktase, eine Alkoholdehydrogenase oder eine Ketonreduktase. Die Enzyme, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, können NADPH (β -Nikotinsäureamid-adeninucleotidphosphat)-abhängig oder von anderen
5 Cofaktoren abhängig sein. Vorzugsweise kommen Mikroorganismen mit NADPH-abhängigen Reduktionssystemen zum Einsatz.

Zellfreie Enzymextrakte dieser Mikroorganismen können durch fachmännisch übliche Methoden, beispielsweise durch French-Press-, Ultraschall- oder Lysozym-Methode, erhalten
10 werden.

Zweckmässig wird die Biotransformation mittels Mikroorganismen durchgeführt, die eine Aldehydreduktase, insbesondere eine NADPH-abhängige Aldehydreduktase, enthalten.

15 Mikroorganismen, die eine NADPH-abhängige Aldehydreduktase enthalten, wie Mikroorganismen der Spezies *Sporobolomyces salmonicolor*, sind bereits von Shimizu et al., 1990, Applied and Environmental Microbiology, 56(8), 2374 - 2377 und Kataoka, M. et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1122, 57-62 (1992), beschrieben. Diese Mikroorganismen können zum einen selbst für das erfindungsgemässe Verfahren eingesetzt werden, zum anderen
20 als Ausgangsmaterial für die Konstruktion von Plasmiden und weiteren geeigneten Mikroorganismen dienen.

Zweckmässig werden für die Biotransformation rekombinante Mikroorganismen eingesetzt, die mit einem Gen codierend für ein Enzym, das befähigt ist eine Carbonylfunktion zu reduzieren,
25 transformiert sind. Mikroorganismen, die mit einem solchen Gen transformiert sein können, sind beispielsweise Mikroorganismen der Gattung *Escherichia*, insbesondere der Spezies *Escherichia coli*, beispielsweise *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* DH5 und *Escherichia coli* HB101.

30 Bevorzugt befindet sich das Gen mit der Reduktase-Aktivität, beispielsweise eine Aldehydreduktase, auf einem zur Transformation geeigneten Vektor, beispielsweise einem Plasmid.

zweckmäßig zusammen mit einem zur Expression des Gens geeigneten Promotor wie dem tac-Promotor (P_{tac}).

5 Sofern die verwendeten Mikroorganismen NADPH-abhängige Enzyme enthalten, wird die Biotransformation zweckmäßig in Gegenwart von NADPH durchgeführt. Das NADPH wird entweder direkt in den erforderlichen Mengen zugesetzt oder in situ hergestellt. Vorteilhaft wird das NADPH in situ hergestellt. Zu diesem Zweck wird die Biotransformation zweckmäßig in Gegenwart eines NADPH-Generators oder Regenerators durchgeführt, d.h. eines Enzyms, das die Bildung von NADPH aus dessen oxidierten Form, $NADP^+$, katalysiert.
10 Zweckmäßig wird als NADPH-Generator oder -Regenerator eine Glucosedehydrogenase eingesetzt, beispielsweise Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*.

Zur Generation von NADPH bei der Biotransformation wird diese zweckmäßig in Gegenwart eines Mikroorganismus durchgeführt, der den NADPH-Generator exprimiert. Insbesondere
15 werden hierzu rekombinante Mikroorganismen verwendet, die mit dem für den NADPH-Generator codierenden Gen transformiert sind. Das Gen für den NADPH-Generator befindet sich hierbei bevorzugt auf einem zur Transformation geeigneten Vektor, beispielsweise einem Plasmid, zweckmäßig zusammen mit einem zur Expression des Gens geeigneten Promotor wie dem tac-Promotor (P_{tac}).

20

Für die Herstellung der Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate der allgemeinen Formel I mit einem ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes, NADPH-abhängiges Enzym, beispielsweise eine NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase, enthaltenden Mikroorganismus in Gegenwart eines NADPH-Generators können verschiedene Mikroorganismen eingesetzt
25 werden, von denen einer zur Reduktion der Carbonylfunktion und einer zur Bildung von NADPH befähigt ist. Vorteilhaft enthalten die erfindungsgemäß verwendeten, zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigten Mikroorganismen aber bereits selbst ein für einen NADPH-Generator oder -Regenerator codierendes Gen, beispielsweise ein Gen codierend für eine Glucosedehydrogenase.

30

Vorteilhaft werden für die Biotransformation rekombinante Mikroorganismen eingesetzt, die mit einem für ein NADPH-abhängiges Enzym, beispielsweise einem für eine NADPH-

abhängige Aldehydreduktase codierenden Gen, und einem für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise einem für eine Glucosedehydrogenase codierenden Gen, transformiert sind. In einer möglichen Ausführungsform befinden sich diese Gene zur Expression auf einem einzigen Plasmid. In einer weiteren Ausführungsform liegen diese Gene auf verschiedenen, miteinander kompatiblen Plasmiden vor.

Die Biotransformation kann also vorteilhaft mittels Mikroorganismen durchgeführt werden, die enthalten:

- mindestens einen Vektor, beispielsweise ein Plasmid, der ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, enthält;
- mindestens zwei Vektoren, beispielsweise Plasmide, von denen der eine ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, und der andere ein Gen für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise ein Glucosedehydrogenase-Gen; enthält, oder
- mindestens einen Vektor, beispielsweise ein Plasmid, der sowohl ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, als auch ein Gen für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise ein Glucosedehydrogenase-Gen; enthält.

Vorzugsweise wird die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *E. coli* JM109 oder *E. coli* DH5, transformiert mit mindestens zwei Plasmiden enthaltend jeweils ein Aldehydreduktase- oder ein Glucosedehydrogenase-Gen, oder mittels Mikroorganismen der Spezies *E. coli* HB101 oder *E. coli* DH5, transformiert mit mindestens einem Plasmid, welches beide Gene, das Aldehydreduktase- und das Glucosedehydrogenase-Gen enthält, durchgeführt. Insbesondere wird die Biotransformation mit *E. coli* JM109 und *E. coli* DH5, enthaltend ein Aldehydreduktase- und ein Glucosedehydrogenase-Gen, durchgeführt. Selbstverständlich kann die Biotransformation auch mit verschiedenen Mikroorganismen, die jeweils nur eines der genannten Gene enthalten, durchgeführt werden.

Fig. 1 zeigt die Struktur eines für die vorliegende Erfindung geeigneten Plasmids, pKAR, das das Gen für die NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor*

zusammen mit dem Promotor P_{lac} und einer Ampicillin (Ap)-Resistenz als Selektionsmarker enthält.

Fig. 2 zeigt die Struktur eines weiteren für die vorliegende Erfindung geeigneten Plasmids, pKKGDH, das das Gen für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* zusammen mit dem Promotor P_{lac} und einer Kanamycin (Km)-Resistenz als Selektionsmarker enthält.

Der Mikroorganismus *E. coli* JM109, enthaltend das Plasmid pKAR mit einem Gen codierend für die NADPH-abhängige Aldehydreduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor* und das Plasmid pKKGDH mit einem Gen codierend für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*, wurde am 16.12.1997 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), D-38124 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, unter der Bezeichnung DSM 11902 gemäss Budapester Vertrag hinterlegt. Der Mikroorganismus *E. coli* DH5, enthaltend die Plasmide pKAR und pKKGDH, wurde am 7.12.1998 bei der zuvor beschriebenen Hinterlegungsstelle unter der Bezeichnung DSM 12566 gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

Die Expression der Gene kann abhängig vom Expressionssystem erfolgen. Bei den erfindungsgemäss bevorzugt verwendeten Expressionssystemen kann die Expression der Gene beispielsweise durch IPTG (Isopropylthiogalactosid) induziert werden, wenn als Mikroorganismus *E. coli* JM109 oder *E. coli* HB101 verwendet werden. Bei der Verwendung von *E. coli* DH5 ist die Induktion mit IPTG, wie fachmännisch bekannt, nicht notwendig.

Die Biotransformation kann nach üblichem Anzüchten der Zellen in einem einphasigen oder zweiphasigen System, vorzugsweise in einem zweiphasigen System, durchgeführt werden.

Als einphasiges System können fachmännisch übliche Puffer-Medien wie beispielsweise niedermolare Phosphatpuffer oder Tris-Puffer angewendet werden.

Als zweiphasiges System können die genannten fachmännisch üblichen Puffer-Medien zusammen mit einem für das Edukt löslichen organischen Lösungsmittel verwendet werden. Als organische Lösungsmittel sind beispielsweise Ester, Alkohole, halogenierte Kohlenwas-

serstoffe, Ether, aliphatische C_{5-12} -Kohlenwasserstoffe oder aromatische Kohlenwasserstoffe geeignet. Als Ester können Essigsäureester wie Essigsäuremethyl-, Essigsäureethyl-, Essigsäurepropyl- und Essigsäurebutylester verwendet werden. Als Alkohole können C_{4-10} -Alkohole wie Hexanol, Heptanol und Octanol verwendet werden. Als aromatische Kohlenwasserstoffe können beispielsweise Benzol, Toluol und Xylol verwendet werden. Als halogenierte Kohlenwasserstoffe können beispielsweise Chloroform und Dichlormethan verwendet werden. Als Ether können beispielsweise Diethylether, Tetrahydrofuran, Methyl-tert-butylether und Dibutylether verwendet werden. Als aliphatische C_{5-12} -Kohlenwasserstoffe sind beispielsweise Pentan, Hexan, Heptan, Octan, Nonan und Decan geeignet.

10

Geeignet ist ebenfalls ein zweiphasiges System in welchem die zweite Phase aus dem Edukt und / oder aus dem Produkt besteht. Um die Löslichkeit des Eduktes zu erhöhen, können Cosolvenzien eingesetzt werden. Als Cosolvenzien können entweder niedermolekulare aliphatische Alkohole wie beispielsweise Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, tert-Butanol oder inerte Lösungsmittel wie beispielsweise Dimethylsulfoxid, Aceton, Acetonitril verwendet werden.

15

Üblicherweise wird die Biotransformation in Gegenwart einer C-Quelle durchgeführt. Als C-Quelle sind beispielsweise Kohlenhydrate wie Glucose, Fructose oder Saccharose und Zuckeralkohole wie Glycerin geeignet.

20

Der pH-Wert der Medien kann in einem Bereich von 5 bis 10, vorzugsweise von 6 bis 8, liegen.

Zweckmässig wird die Biotransformation bei einer Temperatur von 5 bis 60 °C, vorzugsweise von 10 bis 40 °C, durchgeführt.

25

Nach einer Umsetzungszeit von wenigen Minuten bis 50 h, kann dann das gewünschte Produkt in hoher Ausbeute und Enantiomerenreinheit (ee) isoliert werden.

30

Beispiele**Beispiel 1****5 Anzucht der Mikroorganismen**

Zellen von *E. coli* JM109/pKAR,pKKGDH (DSMZ 11902) wurden in einem 20 l Fermenter in 12 l Mineralsalzmedium (Tabelle 1) bei 22 °C angezüchtet. Nach 6 h wurde IPTG hinzugegeben, um die Zellen zu induzieren. Dann wurde Glycerin hinzugegeben und die Zellen bis zu einer optischen Dichte $OD_{650nm} = 41,8$ innerhalb 52 h angezüchtet. Dann wurden die

10 Zellen bei -80 °C aufbewahrt.

Tabelle 1

Hefeextrakt	0,5 g/l
Glycerin	30 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,8 g/l
CaCl ₂	0,16 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g/l
SLF-Lösung	1,0 ml/l
Fe-EDTA-Lösung	1,5 ml/l
PPG-2000	0,1 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,0 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
K ₂ HPO ₄	1,0 g/l
Thiamin	10 mg/l

SLF-Lösung:

KOH	15,1 g/l
EDTA Na ₂ x 2 H ₂ O	100 g/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	9,0 g/l
MnCl ₄ x 4H ₂ O	4,0 g/l
H ₃ BO ₃	2,7 g/l
CoCl ₃ x 6H ₂ O	1,8 g/l
CuCl ₂ x 2H ₂ O	1,5 g/l
NiCl ₂ x 6H ₂ O	0,18 g/l
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,27 g/l

Fe-EDTA-Lösung:

KOH	10 g/L
EDTANa ₂ x 2H ₂ O	50 g/L
FeSO ₄ x 7H ₂ O	20 g/l

Beispiel 2**Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester**

- 5 a) Zu 800 ml Mineralsalzmedium (Tabelle 1) enthaltend *E. coli* JM109/ pKAR,pKKGDH bei einer OD_{650nm} von 7,2 wurden 140 g Glucose und 0,56 g $NADP^+$ hinzugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurde hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2 l Fermenter gegeben, bei 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min.) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M Na_2CO_3 auf 6,0 gehalten.
- 10 Nach 24 h enthielt die organische Phase 48 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von >99%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 67,8 %.
- b) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,0) enthaltend die Mikroorganismen
- 15 gemäss Beispiel 1 bei einer OD_{650nm} von 30,7 wurden 140 g Glucose und 0,56 g $NADP^+$ hinzugefügt. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugegeben und die resultierende Mischung in einen Fermenter entsprechend Beispiel 2a eingespeist. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M Na_2CO_3 auf pH 6,0 gehalten. Nach 25 h wurden nochmals 10 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester hinzugefügt. Nach 45
- 20 h enthielt die organische Phase 49 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von > 99 %, entsprechend einer molaren Ausbeute von 60,6 %.
- c) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend *E. coli* JM109/ pKAR,pKKGDH bei einer OD_{650} von 7,6 wurden 140 g Glucose und 50 mg $NADP^+$
- 25 zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na_2CO_3 auf 6.0 gehalten. Weitere 50 mg $NADP^+$ wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 50 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-
- 30 hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von >99,8%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 71%

- d) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR, pKKGDH bei einer OD_{650} von 6,5 wurden 140 g Glucose und 50mg $NADP^+$ zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na_2CO_3 auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg $NADP^+$ wurden jeweils nach 5 h und 26 h zugegeben. Nach 46 h enthielt die organische Phase 35 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von 99,7%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 51%.

Beispiel 3

Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureisopropylester

- a) Zu 800 ml Mineralsalzmedium entsprechend Beispiel 1 enthaltend E. coli JM109/pKAR, pKKGDH bei einer OD_{650nm} von 9,7 wurden 140 g Glucose und 0,56 g $NADP^+$ hinzugefügt. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoressigsäureisopropylester wurden hinzugegeben und die resultierende Mischung in einem Fermenter entsprechend Beispiel 2 eingespeist. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M Na_2CO_3 auf pH 6,0 gehalten. Nach 21 h enthielt die organische Phase 42,2 g (R)-4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureisopropylester mit einem ee-Wert von >99 %, entsprechend einer molaren Ausbeute von 59,7%.

- b) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR, pKKGDH bei einer OD_{650} von 8,5 wurden 140 g Glucose und 50mg $NADP^+$ zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatisopropylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na_2CO_3 auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg $NADP^+$ wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 32 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-

hydroxybuttersäureisopropylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 46%.

5 Beispiel 4

Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurehexylester

Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/ pKAR,pKKGDH
10 bei einer OD₆₅₀ von 9,5 wurden 140 g Glucose und 50 mg NADP⁺ gegeben. 400 ml
Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetathexylester wurden hinzugefügt und die
resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft
(400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na₂CO₃ auf 6,0 gehalten. Weitere
50 mg NADP⁺ wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die
15 organische Phase 2 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurehexylester mit einem ee-Wert von
>99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 3%.

Beispiel 5

20

Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurecyclohexylester

Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei
einer OD₆₅₀ von 8,9 wurden 140 g Glucose und 50 mg NADP⁺ zugegeben. 400 ml Butylacetat
25 enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatcyclohexylester wurden hinzugefügt und die
resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft
(400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na₂CO₃ auf 6,0 gehalten. Weitere
50 mg NADP⁺ wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die
organische Phase 16 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurecyclohexylester mit einem ee-
30 Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 23%.

Beispiel 6**Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurebenzylester**

- 5 Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei einer OD_{650} von 9,0 wurden 140 g Glucose und 50 mg $NADP^+$ zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatbenzylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na_2CO_3 auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg $NADP^+$
- 10 wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 6 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurebenzylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 9%.

15 Beispiel 7**Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäure-2-ethoxyethylester**

- Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei
- 20 einer OD_{650} von 10,2 wurden 105 g Glucose und 37,5mg $NADP^+$ zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 35 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethoxyethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na_2CO_3 auf 6,0 gehalten. Weitere 37,5 mg $NADP^+$ wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die
- 25 organische Phase 4 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethoxyethylester mit einem ee-Wert von 98,6%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 12%.

Beispiel 8**Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäure-2-(2-ethoxyethoxy)ethylester**

- 5 Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei einer OD_{650} von 10,7 wurden 105 g Glucose und 37,5 mg $NADP^+$ zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 35 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethoxyethoxyethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na_2CO_3 auf
- 10 6,0 gehalten. Weitere 37,5 mg $NADP^+$ wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 5 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethoxyethoxyethylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 16%.

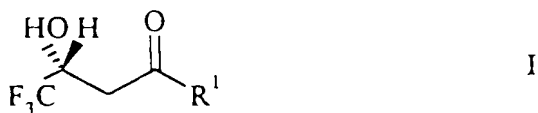
15

Beispiel 9**Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäuremethylester**

- 20 Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei einer OD_{650} von 11,4 wurden 105 g Glucose und 37,5mg $NADP^+$ zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 33 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatmethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na_2CO_3 auf 6,0 gehalten. Weitere
- 25 37,5 mg $NADP^+$ wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 3,6 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäuremethylester mit einem ee-Wert von 96,1%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 7%.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel



worin

10 R^1 $-OR^2$, worin R^2 Wasserstoff, C_{1-10} -Alkyl, C_{1-10} -Alkenyl, C_{3-8} -Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist,
 $-NR^3R^4$, worin R^3 und R^4 gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff, C_{1-10} -Alkyl, C_{1-10} -Alkenyl, C_{3-8} -Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder
 $-SR^5$, worin R^5 Wasserstoff, C_{1-10} -Alkyl, C_{1-10} -Alkenyl, Aryl oder C_{3-8} -Cycloalkyl ist, bedeutet,

15 umfassend die Umsetzung eines Trifluoracetessigsäurederivats der allgemeinen Formel



20 worin R^1 die genannte Bedeutung hat, mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels
25 Mikroorganismen der Gattung Escherichia durchgeführt wird, die mit einem Gen transformiert sind, das für ein Enzym codiert, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB 101 oder *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit einem Gen transformiert sind, das für ein Enzym codiert, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren.
- 5 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101 oder *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit Genen transformiert sind, die sowohl für ein Enzym, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, als auch für eine Glucosedehydrogenase codieren.
- 10 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109 oder der Spezies *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit den Plasmiden pKAR und pKKGDH transformiert sind, wie hinterlegt unter der Hinterlegungsnummer DSM 11902 bzw. DSM 12566.
- 15 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation bei einer Temperatur von 5 bis 60°C durchgeführt wird.
- 20 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation bei einem pH von 5 bis 10 durchgeführt wird.

1/1

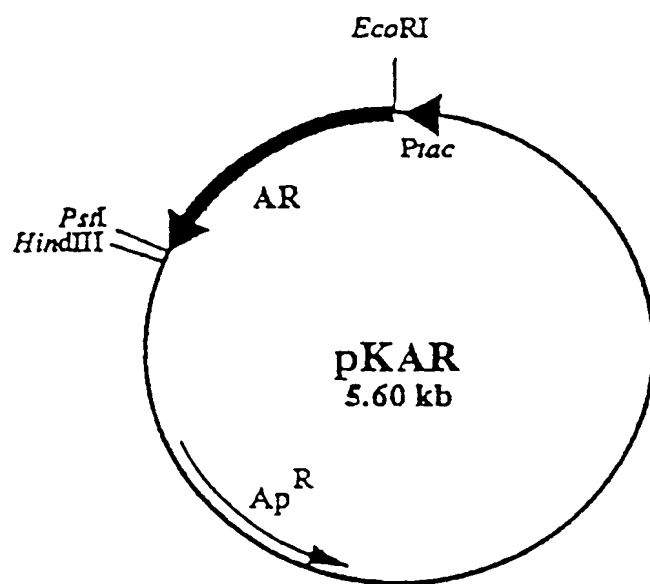


Fig. 1

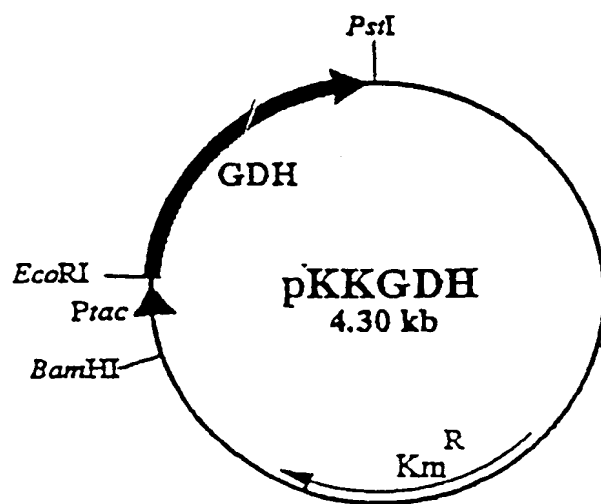


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/01017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/53 C12P7/42 C12P7/62 C12P11/00 C12P13/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 18138 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 16 September 1993 see page 10 - page 16; claim 5; example 3; table 4	1,6,7
Y	see claim 5; example 3; table 4	2,3
Y	KITA: "cloning of the aldehyde reductase gene from a red yeast, Sporobolomyces salmonicolor, and characterization of the gene and its product" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 62, no. 7, July 1996, pages 2303-2310, XP002105940 see page 2308 - page 2309; figures 2,3,7 -/--	2,3



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 1999

Date of mailing of the international search report

29/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I. International Application No

PCT/EP 99/01017

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EHRLER ET AL: "Notiz über microbiologische Umsetzungen mit Halobacterium halobium: Reduktion von 3-Oxobutansäure-ethylester und Hydrolyse von 3-Hydroxybutansäure-ethylester. Cooperative Effekte von Reduktase und Hydrolase" HELVETICA CHIMICA ACTA, vol. 72, 1989, pages 793--799, XP002008201 see page 796 - page 798; table 2 ---	1,6
A	EP 0 645 453 A (DAICEL CHEM) 29 March 1995 see page 7, line 31 - line 51; examples 16-19 -----	2-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/01017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9318138 A	16-09-1993	CA 2117482 A	16-09-1993
		DE 59306681 D	10-07-1997
		DK 630402 T	22-12-1997
		EP 0630402 A	28-12-1994
		JP 7505770 T	29-06-1995
		US 5523223 A	04-06-1996
EP 0645453 A	29-03-1995	JP 7231785 A	05-09-1995
		US 5763236 A	09-06-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/53 C12P7/42 C12P7/62 C12P11/00 C12P13/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 18138 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 16. September 1993 siehe Seite 10 - Seite 16; Anspruch 5; Beispiel 3; Tabelle 4	1,6,7
Y	siehe Anspruch 5; Beispiel 3; Tabelle 4 ---	2,3
Y	KITA: "cloning of the aldehyde reductase gene from a red yeast, Sporobolomyces salmonicolor, and characterization of the gene and its product" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 62, Nr. 7, Juli 1996, Seiten 2303-2310, XP002105940 siehe Seite 2308 - Seite 2309; Abbildungen 2,3,7 --- -/--	2,3

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juni 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Klompenburg, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EHRLER ET AL: "Notiz über microbiologische Umsetzungen mit Halobacterium halobium: Reduktion von 3-Oxobutansäure-ethylester und Hydrolyse von 3-Hydroxybutansäure-ethylester. Cooperative Effekte von Reduktase und Hydrolase" HELVETICA CHIMICA ACTA, Bd. 72, 1989, Seiten 793--799, XP002008201 siehe Seite 796 - Seite 798; Tabelle 2 -----	1,6
A	EP 0 645 453 A (DAICEL CHEM) 29. März 1995 siehe Seite 7, Zeile 31 - Zeile 51; Beispiele 16-19 -----	2-4

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01017

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9318138 A	16-09-1993	CA 2117482 A	16-09-1993
		DE 59306681 D	10-07-1997
		DK 630402 T	22-12-1997
		EP 0630402 A	28-12-1994
		JP 7505770 T	29-06-1995
		US 5523223 A	04-06-1996

EP 0645453 A	29-03-1995	JP 7231785 A	05-09-1995
		US 5763236 A	09-06-1998

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)

